

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Universidad Nacional de La Plata



# Trabajo Final

Tema:

**Acción biofungicida con aplicaciones de *Trichoderma harzianum* para controlar la mancha de la hoja del trigo**

Alumno: Paredes, Alberto Ezequiel

Nro. de legajo: 23501/4

e-mail: ezeparedes@gmail.com

Director: Dra.Cordo, Cristina A.

Co-Director: Dra. Mónaco, Cecilia I.

Fecha de entrega: 07/10/2015

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Cristina A. Cordo, por aceptar ser la directora de este Trabajo Final, por su predisposición para organizar encuentros, reuniones para ayudar a componer, corregir y reformular.

A la Dra. Cecilia I. Mónaco, por ser la co-directora de este Trabajo Final, por colaborar en parte de los ensayos realizados y también por su aporte en la redacción.

A mis Padres, hermana y familia en general, por haberme ayudado para que yo pueda culminar esta carrera universitaria.

A los amigos que me dio esta facultad, con los cuales he pasado grandes momentos de estudio y diversión.

A todos los docentes y no docentes de Fitopatología, Investigadores de CIC por haber colaborado y compartido los días de laboratorio.

A mis compañeros de tesis, con los cuales trabajamos en el campo, laboratorio, etc.

## INDICE

Resumen.....	Pag. 5
Revisión bibliográfica .....	Pag. 6
El cultivo de trigo, las enfermedades y el manejo integrado de las mismas.....	Pag. 6
Importancia del trigo a nivel mundial y nacional.....	Pag. 6
Incidencia de enfermedades en el cultivo.....	Pag. 6
Enfermedades biotróficas.....	Pag. 7
Enfermedades necrotróficas.....	Pag. 9
Mancha de la hoja de trigo.....	Pag. 10
Medidas de control de la mancha de la hoja.....	Pag. 13
Introducción .....	Pag. 17
Objetivo general.....	Pag. 20
Objetivos específicos.....	Pag. 20
Hipótesis.....	Pag. 20
Materiales y métodos.....	Pag. 21
Ensayos de ajuste en la aplicación del agente de control.....	Pag. 21
Adherencia de conidios después del peleteado.....	Pag. 21
Supervivencia de conidios después de la aplicación aérea.....	Pag. 21
Experimento de campo.....	Pag. 22
Material vegetal.....	Pag. 22
Producción de inóculo de <i>Z. tritici</i> .....	Pag. 22
Producción de inóculo de <i>T. harzianum</i> .....	Pag. 22
Preparación de la semilla.....	Pag. 22
Tratamientos a realizados.....	Pag. 23
Ensayos de campo para el biocontrol de la mancha de la hoja.....	Pag. 24

Monitoreo de las condiciones ambientales.....	Pag. 24
Evaluación y análisis estadísticos.....	Pag. 24
Resultados.....	Pag. 25
Clima.....	Pag. 28
Severidad.....	Pag. 29
Efecto total de la enfermedad.....	Pag. 30
Discusión.....	Pag. 32
Conclusiones.....	Pag.35
Bibliografía.....	Pag. 37

## RESUMEN

La inestabilidad de las cosechas de cultivos agrícolas, la mayoría de las veces, está relacionada con las condiciones climáticas favorables para la ocurrencia de enfermedades. Sin embargo en Argentina como en el resto del mundo, se ha manifestado un aumento de la productividad experimentado por una fuerte utilización de insumos (herbicidas, fungicidas e insecticidas) y tecnología. Este incremento en la utilización de insumos para el control de plagas y enfermedades aumenta el costo de producción y, consecuentemente, reduce el lucro de la actividad agrícola. Además las sucesivas aplicaciones de productos químicos, atentan contra el medio ambiente y las plagas van adquiriendo resistencia debido a la alta presión de selección que se ejerce. Debido a que la sustentabilidad económica se ve amenazada, los productores tienden a aplicar el manejo integrado de enfermedades (MIE) y buscan alternativas como el control biológico. En el (MIE) las principales estrategias consisten en el uso de cultivares resistentes, en la aplicación de fungicidas basados en el umbral de daño económico (UDE), en el control por prácticas culturales y el uso de agentes de control biológico. El control biológico, como alternativa, constituye una herramienta interesante al momento de mantener algunas adversidades biológicas en niveles de daño tolerables. El objetivo de este trabajo fue evaluar la reducción de la severidad de la mancha de la hoja del trigo (MHT) *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg y Crous (conocido comúnmente como *Mycosphaerella graminicola* y *Septoria tritici*), aplicando suspensiones conidiales de *Trichoderma harzianum* (Th 5cc y Th 118) solas y en combinación con un fungicida foliar, mediante diferentes técnicas de aplicación en tres estadios fenológicos (plántula, macollaje y espigazón). El ensayo se realizó en la Estación J. Hirschhorn durante 2010. Plantas del cultivar Buck 55CL2 fueron inoculadas con el patógeno obteniéndose los siguientes tratamientos: testigo inoculado con *Zymoseptoria tritici*, plantas provenientes de semillas peleteadas con las cepas de *Trichoderma harzianum* e inoculadas con el patógeno, plantas provenientes de semilla peleteada y pulverizadas en hoja con *T. harzianum* e inoculadas o aplicaciones combinada de *T. harzianum* y fungicida aéreo 7 días antes de la inoculación con el patógeno. Se evaluó el control de la enfermedad a través de la disminución de la severidad en los estados de crecimiento EC 31 (principio de encañazón), EC 62 (espigazón) y EC 82 (grano pastoso). Se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE). Los resultados indicaron que con el peleteado de la semilla se alcanzó protección hasta el estado de madurez temprana del grano. Además una aplicación complementaria al peleteado de la semilla, en el estadio de macollaje produjo una reducción de la severidad equiparable a la lograda solo con el fungicida foliar.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### El cultivo de trigo, las enfermedades y el manejo integrado de las mismas

#### Importancia del trigo a nivel mundial y nacional:

El trigo es la principal fuente de hidratos de carbono del mundo occidental. Hoy tiene destinos tales como sémolas para la industria fideera, harinas para panificación industrial y de galletitas. El origen del mismo es la región situada en la Mesopotamia de los ríos Tigris, Eufrates y las montañas adyacentes denominada “Media Luna Fértil” hace aproximadamente entre 7000 y 9000 años AC. Posteriormente por diversas vías se introdujo en Europa y actualmente se encuentra distribuido por todo el mundo.

Hoy en día entre los principales países productores de trigo se encuentra la Unión Europea (la componen 27 países), China, India, Estados Unidos (USA), Canadá, Australia, Pakistán, Ucrania, Turquía, Irán, Argentina. Entre los anteriormente nombrados algunos como China e India vuelcan su producción al mercado interno y aun así no satisfacen sus necesidades y por lo tanto deben importar como también lo hace Egipto, Brasil y Japón entre otros. Los principales exportadores son USA, Unión Europea, Canadá, Australia y Argentina.

La producción mundial de trigo para 2015/ 2016 según predicciones de la FAO es de 723,4 millones de toneladas. En Argentina se obtuvo una producción de aproximadamente 13,9 millones de toneladas para campaña 2014/2015 con un rendimiento promedio de algo más 2650 kg./ha (Fuente MAGyP 2015).

#### Incidencia de enfermedades en el cultivo:

Con respecto a las enfermedades en Argentina el panorama en la zona triguera ha cambiado en los últimos años debido a diversos factores, como el aumento del área influenciada bajo siembra directa, monocultivo, uso de variedades susceptibles, aumento en los niveles de fertilización, uso del riego etc.

Se han mencionado pérdidas de rendimiento producidas por *Zymoseptoria tritici* (mancha de la hoja) que oscilan entre el 20 y 40% y disminuciones de entre 3 y 13% según cultivares con ataques tardíos de la enfermedad. En cuanto a *Drechslera tritici-repentis* (mancha amarilla) se han determinado pérdidas de entre 10 y 20%, habiéndose incrementado considerablemente en campos bajo siembra directa y monocultivo (Chidichimo y Sempé, 2006). Se ha observado que esta enfermedad una vez introducida en un área determinada se vuelve dominante sobre otras manchas producidas por patógenos necrotróficos. Las Royas han causado importantes pérdidas en los rendimientos. Su efecto se ha atenuado por la resistencia genética obtenida en los cultivares actuales, sobre todo a la roya negra. Las pérdidas producidas por fusariosis (*Fusarium* spp.) oscilan entre el 20 y 50%. En cuanto a los carbones han llegado a producir hasta un 16% de espigas enfermas, cuando las semillas no son tratadas con fungicidas adecuados (Simón y Malagrina, 2007)

Entre las enfermedades biotróficas más importantes que afectan al cultivo de trigo podemos mencionar a:

- Roya amarilla o estriada
- Roya anaranjada o de la hoja
- Roya negra o del tallo
- Oídio
- Carbón volador
- Carbón hediondo

Por el lado de las enfermedades necrotróficas las más recurrentes son:

- Fusariosis de la espiga
- Mancha amarilla
- Mancha de la hoja

### **Enfermedades biotróficas**

#### *Roya amarilla*

Organismo causal: *Puccinia striiformis* West end. f. sp. *tritici*.

Los signos de esta enfermedad son pústulas uredosóricas de color amarillento, ordenadas en bandas o estrías que le dan el nombre común a esta roya. Pueden presentarse también en la cara interna de las glumas y en las vainas. Las pústulas teliosóricas constituidas por teliosporas oscuras tienen una tendencia a ocupar la cara superior de las hojas también en forma de estrías y permanecen recubiertas por tejidos epidérmicos durante mucho tiempo. Respecto a la epidemiología, el patógeno sobrevive como micelio y urediniosporas en más de 18 géneros de gramíneas. Las infecciones primarias son producidas por las uredosporas transportadas por el viento.

#### *Roya anaranjada*

Organismo causal: *Puccinia triticina* Eriks.

Los signos de esta roya, son pústulas rojizo-anaranjadas subepidérmicas. Las urediniosporas son de aproximadamente 2 mm. Se distribuyen irregularmente en el haz de la hoja, pueden alcanzar las vainas y espiguillas. Al final del ciclo del cultivo aparecen teliosoros castaño oscuros a negros, dispuestos al azar en el envés de las hojas y en las vainas. Los urediniosoros se diferencian de los de la roya amarilla por su color más intenso y porque en este último caso la distribución es en líneas o en bandas en lugar de

al azar. El momento y zona de ataque es a partir de macollaje en toda la zona triguera. Las condiciones predisponentes se relacionan con la existencia de un periodo crítico el cual involucra una combinación de horas de mojado y una temperatura necesaria para que ocurra la infección. Por lo tanto para que ocurra la misma se necesitan días luminosos con una temperatura entre 15 y 22 °C y 4 hs. de mojado mínimo. La transmisión es por el viento que arrastra las urediniosporas a grandes distancias.

Respecto a la epidemiología de la enfermedad, en la Argentina no se conocen los hospedantes intermediarios, por lo que las teliosporas carecen de importancia como fuente de inóculo inicial. La reinfección anual se produce a través del micelio y uredosporas que se encuentran en los trigos guachos por su carácter de parásito obligado. Además puede afectar a cebada, triticale, *Aegilops* sp.

#### *Roya del tallo*

Organismo causal: *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*.

Los síntomas aparecen comúnmente en tallos y vainas, en caso de ataques severos también afecta hojas y espigas. Las pústulas son más alargadas que las de la roya anaranjada, al romper la epidermis afloran masas pulverulentas de urediniosporas color castaño rojizo. En el haz y envés de las hojas se observan las pústulas negras o teliosoros con teliosporas que desarrollan al final del ciclo del cultivo. A diferencia de las otras royas estos teliosoros aparecen descubiertos tempranamente, por rotura de la epidermis. Laceran los tejidos del tallo, los que pueden tornarse quebradizos, determinando el volcado de las plantas. El momento de ataque es a partir de espigazón, en las zonas de temperaturas más elevadas (zonas I, II N, III). Las condiciones predisponentes son temperaturas entre 20 y 30 °C y mojado de 6 a 8 hs. La transmisión es por las uredosporas transportadas por el viento a grandes distancias. La epidemiología de la enfermedad se basa en que la fuente primaria de infección son las plantas guachas y otras gramíneas hospedantes.

#### *Oídio*

El organismo causal es *Blumeria graminis* (D.C) *tritici* E.O.Speer f.sp. (teleomorfo)

*Oidium monilioides* (Nees)Link (anamorfo)

En las plantas de trigo se presenta con clorosis foliar hasta encañazón. Produce un micelio blanco en el envés de las vainas y láminas, en condiciones de alta humedad. Requiere temperaturas entre 15 a 22°C y HR superior a 95%, también poca amplitud térmica y escasa radiación. Altas densidades y la fertilización nitrogenada incrementan su incidencia. La transmisión es por el viento que transporta los conidios por varios kilómetros. El manejo de la enfermedad es por el uso de cultivares resistentes, por el control de las malezas y plantas guachas, y por el uso de fungicidas sistémicos.



### *Carbón volador*

El agente causal es *Ustilago tritici* (Pers.)C.N.Jensen Kellerm & Swngle (*Ustilago nuda*)

Se observa una destrucción total de la flor y clorosis de la hoja bandera. Sólo queda el raquis en el cual las espiguillas están reemplazadas por una masa pulverulenta de esporas negras con una fina membrana que se rompe fácilmente, liberando las esporas que infectan las espigas sanas. Los síntomas aparecen cuando emerge la espiga, y su distribución en el lote es al azar, ya que la infección proviene de la semilla. Se favorece con alta humedad relativa en floración, y con temperaturas entre 16 y 22°C. La prolongación del periodo de floración por el clima fresco y húmedo favorece la infección. Las primaveras húmedas con vientos suaves son de importancia para una buena diseminación. El manejo de la enfermedad es por el uso de semilla sana, preferiblemente certificada, de variedades con cierta resistencia. Se realiza un tratamiento preventivo con fungicidas sistémicos en la semilla.

### *Carbón hediondo*

Los agentes causales son, *Tilletia laevis khühn* (= *T. foetida*) y *Tilletia tritici* (Bjerk) wint. (= *T. caries*)

En el cultivo, el daño se puede presentar desde espigazón a cosecha resultando dificultoso reconocer las plantas enfermas. Una observación detallada permite detectar espigas erectas, anteras ausentes y plantas de menor porte, sin la leve inclinación de las espigas llenas y una coloración verde azulada.

Los granos de las espigas afectadas son chuzos, livianos o directamente no existen. El contenido de los mismos es reemplazado por una masa pulverulenta oscura. A diferencia del carbón volador, la capa externa de la semilla permanece intacta, pero es destruida fácilmente durante la cosecha. De esta manera se contaminan los granos sanos, a partir de los enfermos desprendiendo un olor característico a pescado en descomposición. *Tilletia tritici* es favorecida por temperaturas del suelo entre 5 y 10°C; las otras especies se activan entre 7 y 20°C. El manejo de la enfermedad es a partir del uso de semilla sana, de cultivares resistentes y realizando tratamiento preventivo con fungicidas de contacto aplicados en semilla.

## **Enfermedades necrotróficas**

### *Fusariosis o golpe blanco*

El agente causal es *Fusarium graminearum* (Schwabe) (teleomorfo *Giberella zeae* Schw. & Petch)

El ataque tiene lugar en las espigas de la planta. Los primeros síntomas son pequeñas áreas pardo-oscuros en la base de las glumas. Luego las espigas pierden el color verde normal tornándose blanquecinas y contrastando con las sanas. Los granos infectados se ven chuzos, ásperos y de coloración blanco rosada en la superficie. La sintomatología

aparece en plantas aisladas o en manchones, y dentro de la espiga, puede atacarla toda o espiguillas por separado. La enfermedad se favorece con lluvias frecuentes, alta humedad relativa y temperaturas de 25°C durante la floración. El rastreo en superficie, la utilización de cultivares susceptibles, la presencia de malezas hospedantes del patógeno, son otros factores que inciden en la ocurrencia de la enfermedad. Para controlar este patógeno se puede realizar un control químico preventivo.

El agente causal puede además producir micotoxinas que originan trastornos en monogástricos.

#### *Mancha amarilla*

El organismo causal es *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (teleomorfo, forma sexual)

*Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem. (Dtr.) (anamorfo, forma asexual)

El patógeno se observa desde que la planta posee 2-3 hojas a macollaje, o en etapas más avanzadas del cultivo. Presenta manchas lenticulares, pequeñas, de color castaño amarillento o amarillo limón, que empiezan desde las hojas de abajo. Luego se tornan necróticas con un halo clorótico en la periferia y en el centro una zona más oscura. Los síntomas se observan en el campo en forma uniforme. Necesita temperaturas de 19 a 22°C, aunque puede desarrollarse en un rango amplio de temperaturas, lluvias y mojado de más de 18 hs de la superficie foliar. La enfermedad se ve favorecida si hay rastreo con inóculo, semillas infectadas, monocultivo de trigo y siembra directa.

#### *Mancha de la hoja (MHT)*

El organismo causal es *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous ( *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J.Schröt in Cohn, *Septoria tritici* Roberge in Desmaz.).

Esta es una enfermedad fúngica, con un patógeno de tipo hemibiótrofo (inicialmente se alimentan de tejido hospedante viviente sin causar síntomas visibles para luego transformarse en necrótrofos), que ha incrementado su incidencia en los campos argentinos a través del aumento en la superficie sembrada bajo el sistema de siembra directa (Stewart *et al.*, 2001). Para las regiones trigueras de Argentina entre los años 1982-1987, la septoriosis de la hoja fue la enfermedad foliar predominante debido a la gran incorporación en las zonas de cultivo de las variedades con germoplasma mexicano. Esta situación se vio agravada, dado que los nuevos cultivares, producidos a partir de aquellos, resultaron en su mayoría altamente susceptibles. Luego en el periodo delimitado por los años 1990-1994 el comportamiento altamente susceptible que caracterizaba a la mayoría de los cultivares se vio en parte revertido debido al reemplazo de estas variedades por aquellas que incorporaban cultivares con germoplasma de origen ruso invernal como fuente progenitora (Galich & Galich., 1996; Cordo *et al.*, 1994).

En California, EEUU se mencionaron pérdidas del orden del 60% al 70%. En Brasil en la Región de Campos Gerais del Estado de Paraná, se estimaron pérdidas del 50% del rendimiento. En Argentina se han cuantificado pérdidas del orden del 5% al 60% según cultivares, ciclo, porte y región triguera (Annone *et al.*,1993).

Actualmente la mancha de la hoja, conjuntamente con la mancha amarilla, se encuentra entre los factores que más afectan los rendimientos del cultivo de trigo, especialmente en las zonas endémicas para cada una de ellas.

Los síntomas se manifiestan al principio como puntos cloróticos en las hojas inferiores, más frecuentemente en las hojas basales próximas al inóculo del suelo, pudiendo aparecer los síntomas en cualquier estado de crecimiento de cultivo (Fig. 1 y 2).



**Figura 1.** Lesiones necróticas con picnidios (puntos negros) producidos por *Z. tritici* en las hojas inferiores de *Triticum aestivum*. (Gentileza Nadia Castillo)

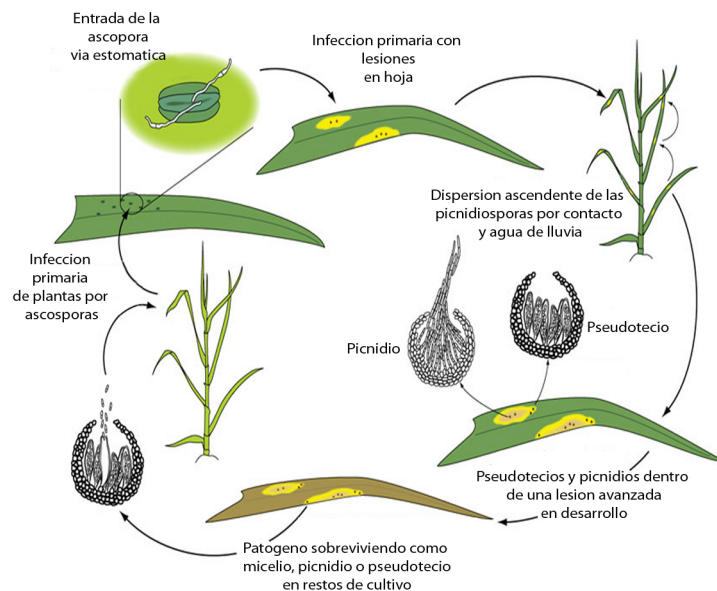


**Figura 2.** Lesiones necróticas sobre las áreas cloróticas producidas por *Z. tritici* en hoja bandera de *Triticum aestivum*.

La velocidad de dispersión del patógeno, desde las hojas inferiores a las superiores, depende de las condiciones climáticas, principalmente lluvias y temperaturas y de la arquitectura y reacción del cultivar.

Los cuerpos fructíferos producidos por este hongo, los picnidios y los ascocarpos, liberan cíclicamente y continuamente, conidios y/o ascosporas formados en tejidos plisionecróticos. Estos se depositan en las hojas y vainas inferiores, penetran en los tejidos y dan origen a las primeras manchas en un intervalo de 10 a 15 días (Ver ciclo de la enfermedad en Fig. 3). Las primeras lesiones aparecen como ya se mencionó, en las hojas inferiores, como manchas pequeñas de color amarillo, que luego avanzan sobre las hojas superiores. Estas manchas presentan una forma oval, coloración amarillo verdoso o gris verdoso. Inicialmente se presentan lesiones acuosas, que luego confluyen irregularmente, necrosando el tejido afectado. Sobre las lesiones foliares puede observarse la presencia de líneas negras ordenadas, constituidas por los cuerpos fructíferos del hongo (picnidios) los cuales darán origen a las infecciones secundarias a través principalmente de la salpicadura ocasionada por las gotas de lluvia que transportan el inóculo hacia las hojas superiores. En condiciones de elevada humedad relativa liberan un cirro blanco mucilaginoso que contiene las esporas. En ataques severos las hojas y vainas se necrosan completamente, quedando verde sólo el pedúnculo de la espiga. Las hojas secas permanecen rígidas y péndulas, con los bordes ondulados, presentando numerosos picnidios en su superficie.

Para la liberación de los conidios, los picnidios requieren la presencia de agua libre. El transporte de las esporas es siempre por salpicaduras de gota de lluvia y la acción del viento (transporte a corta distancia). La temperatura óptima para la infección es de 15- 20 °C y 72 a 96 hs. de mojado (Sinavimo, Senasa, 2013).



**Figura 3.** Ciclo de la enfermedad MHT agente causal *Z. tritici*.

## Medidas de control de la mancha de la hoja

Entre las principales estrategias que conforman el sistema de **manejo Integrado de enfermedades** (MIE), aplicadas a la MHT, figuran las siguientes: la resistencia genética, las medidas de manejo del cultivo (sanidad de la semilla, la rotación de los cultivos, el manejo de la fertilización, la materia orgánica y el pH de suelo, la preparación del suelo, la densidad de la siembra, los modelos de predicción y la época de siembra), el control químico y biológico (Carmona, 2003). La aplicación de estas tácticas tiene presente el retorno económico y la sustentabilidad ecológica, tendiendo como principio a la racionalización del uso de agroquímicos.

### *Resistencia genética*

*Z. tritici* es un patógeno genéticamente altamente diverso (McDonald *et al.*, 1999); por otra parte, el hongo puede reproducirse sexualmente varias veces durante la estación de crecimiento de trigo (Kema *et al.*, 1996). Este hábito aumenta el riesgo de la adaptación del patógeno a los genes de resistencia adquiridos en las variedades de trigo.

En la década del 70' la resistencia a la septoriosis de la hoja era escasa en las variedades comerciales que poseían buenas características agronómicas, tales como alto rendimiento, baja altura y una madurez temprana (Eyal, 1972). Rosielle y Brown, (1979) demostraron que cultivares con caña larga y madurez tardía eran menos afectados y, a menudo, portaban ciertos genes de resistencia que actuaban independientemente de los genes que rigen estos caracteres morfofisiológicos. Simón *et al.*, (2005) demostraron que no existe correlación entre genes que gobiernan la altura de los cultivares y la resistencia.

Tanto la resistencia cualitativa y cuantitativa ahora han sido identificadas en el germoplasma de trigo. La primera normalmente produce una resistencia casi completa que es aislada-específica, y simplemente heredaron, a raíz de una relación gen por gen (Brading *et al.*, 2002). En contraste, la resistencia cuantitativa o parcial es incompleta, poligénica (Zhang *et al.* 2001), y aislada no específica (Chartrain *et al.* 2004), y a menudo más durable (Simón y Cordo, 1998).

Los cultivares resistentes proporcionan un enfoque eficaz, económico y respetuoso con el medio ambiente para el control de epidemias MHT (Eyal, 1999).

Uno de los principales inconvenientes en el desarrollo de los programas de mejoramiento es la alta variabilidad patogénica del hongo. Debido a esto, cultivares de trigo que resultan resistentes en ciertos países o regiones, pueden no tener el mismo comportamiento en otras latitudes. La variabilidad genética de estos fitopatógenos, condiciona la durabilidad de la resistencia. Al analizar los patosistemas con agentes causantes necrotróficos (por ejemplo de mancha foliares), se observa claramente que la resistencia se ve debilitada en corto tiempo.

Además se ha observado que cuando las condiciones ambientales son altamente predisponentes para el desarrollo de la enfermedad, en especial por alta humedad, una

fertilización nitrogenada elevada puede causar incluso incrementos de la severidad (Simón *et al.*, 2002, 2003).

También hay que extremar el uso de fungicidas para controlar la MHT, ya que son caros, no del todo fiables (Chartrain *et al.*, 2004) y puede conducir a la aparición de cepas de fungicidas resistentes.

En la última década se han realizado importantes avances tendientes a incrementar la resistencia a patógenos que ocasionan las manchas foliares en trigo. La utilización de marcadores moleculares ha permitido localizar dieciocho genes (Simón *et al.*, 2012) que condicionan la resistencia a *Mycosphaerella graminicola*. Se han mapeado los genes *Stb1* en el cromosoma 5B (Adhikari *et al.*, 2004c) el *Stb2* en el cromosoma 3B, el *Stb3* en el 6D (Adhikari *et al.*, 2004b), el *Stb4* y el *Stb5* en el 7D (Adhikari *et al.*, 2004a; Arraiano *et al.*, 2001; Simón *et al.*, 2007), el *Stb6* en el 3A (Brading *et al.*, 2002), el *Stb7* en el 4A (McCartney *et al.*, 2002) el *Stb8* en el 7B (Adhikari *et al.*, 2003), el gen *Stb9* en el cromosoma 2B (Chartrain, 2004), el gen *Stb10* y el gen *Stb12* en los cromosomas 1D y 4A respectivamente. (Chartrain *et al.*, 2005a), y el gen *Stb11* en el 1B (Chartrain *et al.*, 2005b). Así mismo se han localizado diversos QTL's, Eriksen *et al.*, (2003) describieron dos QLTs en los cromosomas 2D y 3A y un gen y un gen mayor de resistencia en el 3A en el cultivar "Senat". Simón *et al.*, (2004) identificaron dos QLT's en los cromosomas 1D y 6B del trigo sintético W7984 en plántula y en los cromosomas 3D y 7B en estado adulto. Además se han publicados los siguientes genes: *Stb13* en el cromosoma 7BL (McIntosh *et al.*, 2007), *Stb14* en el 3BS (McIntosh *et al.*, 2007), *Stb15* en el 6AS (Arraiano *et al.*, 2007), *Stb16* en el 3DL (Ghaffari *et al.*, 2011a), *Stb17* en el 5AL (Simón *et al.*, 2004), y el *Stb18* en el 6DS (Ghaffari *et al.*, 2011b).

### *Medidas culturales*

Para la septoriosis del trigo se asume que el inóculo primario lo constituyen los conidios dispersados por el viento en las gotitas de lluvia. La importancia de la forma teleomórfica (*Mycosphaerella graminicola*) como fuente de inóculo ha sido subestimada.

Los ascocarpos pueden constituirse en inóculo primario importante cuando el resto cultural es dejado sobre el suelo.

En siembra directa, los tallos de trigo cortados después de la cosecha que permanecen en pie, deben ser considerados como los más importantes, pues resisten mejor la acción descomponedora de los microorganismos. También así se ve facilitada la dispersión de los conidios y ascosporas hacia las hojas inferiores del cultivo de trigo, en el caso de monocultivo (Carmona *et al.*, 1999).

El mismo autor menciona que la incorporación inmediata de los residuos culturales infectados, a través de la labranza, después de la cosecha, puede reducir considerablemente la severidad de la enfermedad al impedir que el inóculo sea liberado para el alcance de los tejidos verdes de las hojas emergidas en el nuevo cultivo. La

siembra directa será más conveniente con rotación con especies no susceptibles, como por ejemplo leguminosas, forrajeras, lino, etc.

En cuanto a los hospedantes secundarios (gramíneas nativas y otras invasoras) y plantas voluntarias de trigo, triticale, centeno deben ser eliminados de las proximidades del cultivo en ambos casos, ya que las primeras pueden ser colonizadas y sirven como fuente de inóculo para la septoriosis y en el caso de las plantas voluntarias, la septoriosis puede ser encontrada en las mismas durante el verano y el otoño. Como en el caso anterior, el hongo es mantenido colonizando estas plantas que vegetan durante las épocas previas al cultivo y luego los conidios son llevados, por las salpicaduras de lluvia, al trigo desde sus primeros estadios de crecimiento. Así funcionan como verdaderos puentes verdes en el intervalo entre dos cultivos de trigo (Carmona *et al.*, 1999).

La rotación de cultivos es la siembra de una misma especie vegetal en un mismo campo, en una misma estación de cultivo, donde los restos culturales del cultivo anterior fueron eliminados biológicamente. Rotar debe dar la idea de evitar sembrar un cultivo sobre sus propios rastros (Carmona *et al.*, 2004).

En la rotación, el rastrojo es mineralizado por la acción de descomposición de los microorganismos del suelo de tal manera que el inóculo fue eliminado o mantenido por debajo del umbral numérico de infección. (Carmona *et al.*, 2004)

La rotación de cultivo tiende a erradicar el patógeno de las áreas donde el trigo fue cultivado, y sólo es eficaz si el cultivo no se repite por dos o tres años y si no hay hospederos secundarios o plantas voluntarias. La rotación erradica el patógeno debido a que le produce la muerte por inanición, no habiendo alimento (plantas vivas voluntarias o cultivadas, hospedantes secundarios y sus restos culturales), el hongo perecerá (Carmona *et al.*, 1999).

### *Control químico*

Los fungicidas constituyen una táctica consistente, flexible y económicamente factible, por lo que es importante comprometernos con su uso adecuado, atendiendo no solo a la sustentabilidad económica, social y ambiental, sino al manejo cuidadoso de las moléculas con el fin de prolongar su vida útil (Gullino y Kuijpers, 1994; Knight *et al.*, 1997; Ragsdale, 2000; Rosenberg, 2003; Siqueira de Azevedo, 2001, 2007). Al momento de seleccionar un fungicida es entonces esencial considerar su toxicidad a los humanos y a la vida silvestre, su impacto ambiental, los residuos en los alimentos y su compatibilidad con otras tácticas estratégicas de manejo integrado (Knight *et al.*, 1997).

Los fungicidas son sustancias químicas que, aplicados a las plantas, las protegen de la penetración y/o posterior desarrollo de hongos patógenos en sus tejidos (Fungicida: del latín, fungus = hongo + caedo = matar; sustancia química que mata hongos) (Carmona., 2007).

Una sustancia química para ser fungicida no necesita matar al hongo. Algunas controlan enfermedades inhibiendo el crecimiento micelial o su esporulación. Estas son llamadas

sustancias fungistáticas y antiesporulantes. La existencia de fungicidas sistémicos del grupo químico de los triazoles, y los nuevos principios activos mesostémicos derivados de las estrobilurinas, fungitóxicos a los agentes causales de las royas y manchas, ofrecen una medida segura de control en los cultivos susceptibles.

Para aquellos lotes donde el potencial de rendimiento resulte elevado, es conveniente la elección de la mezcla de estrobilurinas + triazol por combinar mecanismos y modos de acción y sumar el efecto preventivo, curativo y erradicante. No es aconsejable disminuir las dosis recomendadas. Disminuir las dosis pone en riesgo la residualidad del fungicida y la sensibilidad de las cepas al producto (resistencia del hongo al producto).

Tipo de fungicidas para enfermedades (Carmona., 2007)

a) Triazoles: Fungicidas inhibidores de la síntesis de esteroides (ISE). Eficaces para manchas foliares, oídios, royas y algunos para fusariosis. Son aquellos absorbidos por las raíces de las plantas y a través de las hojas, siendo, posteriormente, translocados por el sistema conductor de la planta (xilema). Estos fungicidas fueron desarrollados en la década de 1960, primeramente, para combatir micosis en seres humanos.

Un gran número de fungicidas presentan este mecanismo de acción como por ejemplo: Triazoles (bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, difenoconazol, epoxiconazol, flutriafol, fluquinconazol, hexaconazol, metconazol, propiconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefom, triadimenol, triciclazol, triticonazol), imidazoles (imazalil, procloraz),

b) Estrobilurinas: Fungicidas eficaces para manchas, oídios y royas.

Estos fungicidas no son sistémicos pero penetran en la hoja. Estas moléculas forman : (a) un depósito libre que puede ser redistribuido por el agua; (b) un depósito más cohesivo en la superficie de la hoja, resistente a la intemperie; (c) un depósito fuertemente asociado con la capa de cera cuticular, muy resistente a la remoción o lixiviación por la lluvia, posibilitando un efecto residual más prolongado; la redistribución en la superficie foliar ocurre a través de la absorción continua a partir de la capa de cera cuticular de las hojas hacia el interior del órgano y también a través de la fase vapor y reabsorción por la cera cuticular, y (d) una fracción que penetra en el tejido foliar. Se aconseja siempre aplicarlas junto a otra molécula como las del grupo de los triazoles

c) Benzimidazoles: (Benomil, carbendazim, tiabendazol, tiofanato metílico). Solamente eficaz para fusariosis.

Este grupo al igual que los triazoles, son sistémicos. El modo de acción de los fungicidas benzimidazoles está basado en sus efectos sobre la integridad de la tubulina. Los microtúbulos son hélices (tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$ ) que forman una parte esencial del citoesqueleto y que participan en la formación del huso y en la segregación de los cromosomas en la división celular. Los benzimidazoles interfieren en la mitosis durante la división en la metafase. El huso mitótico es distorsionado y los



núcleos hijos fracasan en la separación, resultando en la muerte de la célula. Su acción fungicida consiste en la interferencia en la síntesis de ARN, paralizando la división nuclear, semejante al efecto de la colchicina.

### *Control biológico*

Bajo el lema de una agricultura sustentable acorde a estos tiempos, debemos cambiar la concepción de “control” a “manejo integrado”, que hace hincapié sobre la combinación de métodos que suponen alternativas no tan usuales, como la utilización de controladores biológicos.

Además, existen evidencias de que muchas plantas tratadas con factores bióticos (enfermedades potencialmente riesgosas) y/o abióticos (relacionados a organismos patógenos o no), son capaces de producir resistencia sistémica a un grupo grande de patógenos como hongos, bacterias, virus e incluso insectos (Agrios., 2005).

## **INTRODUCCIÓN**

Especies del genero *Trichoderma* han sido usadas para el control de patógenos foliares en plantas de la familia crucíferas, solanáceas y gramíneas. (Rai y Singh, 1980; Scharen y Bryan, 1981; Elad y Kirschner, 1993; Michereff *et al.*, 1995; Dal Bello *et al.*, 2002, 2003; Perelló *et al.*, 2003, 2006). El control de los hongos patógenos por *Trichoderma sp.*, puede ser directo o indirecto (Viterbo *et al.*, 2002). Control directo consiste en la competencia por el espacio y los nutrientes, la producción de antibióticos y la introducción de parásitos, mientras que indirectamente, influye el control de cambios morfológicos y bioquímicos en la planta.

En Argentina se investigó ampliamente sobre el control biológico de enfermedades foliares en cereales. Cordo *et al.*, 2007. trabajó con 14 cepas de *T. harzianum* aplicadas como pelets en la semilla para evaluar la reducción de la MHT en plántulas. Dicho trabajo fue realizado bajo condiciones de invernáculo. Los resultados de esta investigación sugieren que el hongo *T. harzianum* provoca un cambio bioquímico en dichas plantas, en respuesta de defensa, que es similar a la descrita anteriormente por otros investigadores (De Meyer *et al.*, 1998; Howell *et al.*, 2000; Koike *et al.*, 2001; Hanson y Howell 2004).

Perelló *et al.*, (2009) trabajando en el biocontrol de *Septoria tritici* en trigo con cepas de *Trichoderma sp.* logró una reducción de la incidencia de la enfermedad del 40% y de la severidad del 70% cuando se aplicó como recubrimiento de la semilla. Navarrete (2013), evaluó el efecto biocontrolador de dos cepas de *T. harzianum*. aplicadas solas y en combinación con fungicidas, sobre la severidad de la MHT, aplicadas con diferentes técnicas en tres estadios fenológicos (plántula, macollaje, espigazón); la severidad se vió reducida entre un 18,5 y 16,2 % con aplicación de semilla recubierta mientras que la ganancia en el rendimiento fue de 646,6 kg/ha<sup>-1</sup> cuando se reforzó el peleteado de la semilla con 2 aplicaciones aéreas de conidios. Además el mismo autor confirmó que aplicaciones combinadas del biofungicida y el fungicida foliar en media dosis en estado de

macollaje y espigazón no generaron la disminución esperada de la severidad en grano pastoso.

Perelló *et al.*, (2003) estudio la supervivencia de los conidios de *Trichoderma* sp. en plantas de trigo inoculadas con *Drechslera tritici repentis* bajo condiciones de invernáculo., para evaluar el nivel de población. Para algunos aislamientos de *Trichoderma* sp. la población se mantuvo estable, pero en la mayoría de ellos disminuyó después de un mes de observación.

Ninguno de los trabajos mencionados estudió la adherencia de los conidios de *T. harzianum* a la semilla según la concentración del antagonista aplicada. Tampoco se mencionan otros antecedentes sobre la supervivencia de conidios que recubran semillas bajo condiciones de campo.

Las plantas poseen dos mecanismos de respuestas inmunológicas: por un lado la adquisición de resistencia sistémica adquirida, que se produce tras el primer contacto (siempre y cuando éste no sea muy severo e intenso) con el patógeno; y la resistencia sistémica inducida por contacto con factores bióticos o abióticos no patogénicos (Viterbo *et al.*, 2002). La resistencia se observa inicialmente en los sitios primarios de infección (resistencia local inducida), pero luego de un periodo puede detectarse en porciones más alejadas (resistencia sistémica inducida). La manifestación mayor de la adquisición de resistencia se basa en una disminución de los síntomas propios de un patógeno en una especie. El logro de resistencia inducida puede darse también a partir de la inoculación de razas incompatibles del patógeno, con bacterias u hongos no compatibles o muertos, o también con el propio patógeno en estadios en que la planta no es susceptible (Agrios., 2005).

La cuantificación del progreso de una enfermedad en el tiempo es la base para la realización de estudios epifitológicos (Berger., 1977, 1980, 1988). Este autor (1988) analizó la metodología para interpretar el efecto de las diferentes medidas de control sobre las epifitias. Entre los parámetros considerados señala las cantidades inicial y final de la enfermedad, su tasa de incremento y el área bajo la curva de progreso. Shaner y Finney (1977) estudiando la evolución epidémica del oídio del trigo (*Erysiphe graminis f. sp. tritici*) en dos cultivares de diferente comportamiento, determinaron que bajo condiciones ambientales y de nutrición óptimas para la infección, la severidad acumulada de la variedad medianamente susceptible arrojó valores más bajos que la variedad susceptible. Se evidenció que la influencia genética del hospedante es un componente importante en la evolución de la enfermedad.

La eficiencia y la toma de decisión al combinar dos o más estrategias de manejo integrado (MI) puede ser evaluada a través del análisis de las curvas de progreso de la enfermedad en el tiempo. La aplicación de controladores biológicos como *T. harzianum*, puede cumplir entonces una doble función, por un lado, la intervención directa sobre el organismo patógeno en cuestión y por el otro, la generación indirecta de resistencia sistémica inducida. El control directo consiste en influir sobre la competencia por nutrientes y

espacio, el parasitismo o la producción de antibióticos; mientras que el control indirecto comprende cambios morfológicos y bioquímicos en las plantas (Viterbo *et al.*, 2002). La respuesta de cada híbrido o variedad vegetal a la presencia de organismos patógenos o no patógenos es diferente; en este sentido, existen genotipos de rápida respuesta (altamente resistentes) y de respuesta lenta (medianamente resistentes) o incluso nula (no resistentes).

En las plantas, el apoplasto o espacio intercelular forma una zona que los agentes patógenos deben cruzar para colonizar tejidos, por lo tanto conforma un compartimiento importante donde actúan los mecanismos de defensa intrínsecos, como la acumulación de proteasas, glucanasas y quitinasas, etc (Bowles.,1990).

En los cultivares resistentes a *Z. tritici*, la actividad de las enzimas proteolíticas vía apoplástica se ve aumentada (sobre todo la serin proteasa, un compuesto capaz de inhibir la germinación de las esporas del patógeno), mientras que en los individuos con poca o nula resistencia, los cambios en las concentraciones enzimáticas se ven no disturbados o incluso disminuidos por efecto de la infección patogénica activa y en aumento (Segarra *et al.*, 2001). Algo similar podría ocurrir con la aplicación de biocontroladores en los diferentes genotipos a partir del reconocimiento por parte de los vegetales.

En plantas inoculadas con cepas de *Trichoderma harzianum* (Th5cc), la actividad proteolítica antifúngica se vio incrementada, comparada con plantas no inoculadas pero infectadas con *S. tritici*. Estos resultados sugieren que *T.harzianum* estimula la reacción bioquímica de respuesta inducida contra este patógeno (Cordo *et al.*, 2007, Stocco *et al.*, 2015).

### **Objetivo general:**

**Demostrar la reducción de la severidad de la mancha de la hoja del trigo (MHT) producida por *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg y Crous, aplicando suspensiones conidiales de *Trichoderma harzianum* en forma pura o combinada con un fungicida foliar.**

### **Objetivos específicos:**

- Informar sobre aspectos de la metodología de aplicación de conidios del agente biocontrolador, a través de los resultados de adherencia en la semilla luego del peleteado, y la persistencia en la hoja luego de la inoculación aérea.
- Evaluar la severidad de la MHT en todos los estadios de la planta, con aplicaciones del agente biocontrolador en estado puro.
- Evaluar la severidad de la MHT en todos los estadios de la planta con aplicaciones combinadas del agente biocontrolador y un fungicida foliar.
- Comparar las curvas de progreso de la enfermedad para los distintos tratamientos y en los diferentes estadios de crecimiento del trigo.

### **Hipótesis**

1-El número de unidades formadoras de colonias (ufc) de *T.harzianum* recuperadas después del peleteado con diferentes concentraciones de conidios aumenta proporcionalmente con el aumento de las concentraciones ensayadas. Los conidios de *T.harzianum* aplicados en la hoja por pulverización, se presentan a una concentración alta sólo una semana después de la aplicación.

2-Aplicaciones tempranas del agente biofungicida, como pelet en semilla, reducen la severidad de la enfermedad sólo en el estadio de plántula.

3-Es necesario aplicar un suplemento del biofungicida en estadios posteriores al de plántula, para lograr una reducción de la severidad equiparable a la lograda sólo con fungicida foliar.

4-La aplicación combinada del biofungicida y del fungicida foliar en media dosis en el estadio de plántula reduce la severidad en forma similar a una sola aplicación de fungicida foliar en un estadio avanzado.

## MATERIALES Y METODOS

### Ensayos de ajuste en la aplicación del agente de control.

Treinta días antes de la realización del experimento de campo, se ensayó en el laboratorio la adherencia de los conidios a la semilla luego del peleteado. Mientras que el tiempo de supervivencia del biocontrolador pulverizado en la hoja se experimentó en las plantas de trigo en estado de macollaje.

Adherencia de conidios después del peleteado:

Se evaluó la adherencia de los conidios a la semilla. Para ello se prepararon suspensiones de conidios de *T. harzianum* (cepas Th5cc y Th118) a diferentes concentraciones ( $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  y  $10^8$ ) conidios/ml y se procedió al peleteado de las semillas de trigo. Esta técnica consiste en colocar las semillas de trigo en 90 ml. de agar agua al 0,25% con 10 ml. de la suspensión de *T. harzianum* y 1 gota de Tween 20. Dicha solución se llevó a un agitador magnético rotatorio (1000 rpm) durante 20 minutos. Luego las semillas se secaron a temperatura ambiente durante 1 día. Un gramo de semilla peleteada fue lavado en 100 ml. de agua destilada estéril con 0.01% de Tween 20, llevándolas a agitador rotatorio magnético a 1000 rpm durante 20 min. Luego, 1 ml. de la suspensión de conidios para cada concentración se sembró en caja de Petri sobre el medio de cultivo selectivo para *T. harzianum* y se llevó a estufa a 24°C durante una semana. Trascorrido ese tiempo, se contaron las colonias de *T. harzianum* y se calculó la cantidad de conidios que se adhirieron a la semilla de trigo teniendo en cuenta la dilución sembrada.

Supervivencia de conidios después de la aplicación aérea.

Para evaluar el nivel de la población de *T. harzianum* en las hojas después de la aplicación aérea, se tomaron diez hojas a partir de las plantas de trigo en cada parcela de los tratamientos con el biocontrolador. Un gramo de hojas se colocaron en 100 ml de agua destilada estéril con 0,01% de Tween y se agitó durante 20 min. en un agitador rotatorio (1000 rpm). La suspensión fue diluida hasta una concentración  $10^{-2}$  v/v y alícuotas de 1 ml se sembraron en placas de Petri con el medio selectivo de *Trichoderma*, contando las colonias típicas después de incubar en estufa a 24°C y oscuridad. Se realizaron muestreos periódicos a intervalos de 4, 7, 9, 14, 16 y 22 días desde el momento de la aplicación del biocontrolador. Se registraron las variables climáticas que afectaron el periodo de investigación (23 de septiembre al 15 de octubre).

Los resultados de ufc./g de semilla obtenidos en el experimento de adherencia de conidios, se analizaron por ANOVA y las medias se compararon con el test de diferencias mínimas significativas (LSD) al nivel de 5%.

## Experimento de campo

El ensayo se llevó a cabo en la Estación Experimental Julio Hirschhorn de los Hornos, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de La Plata, durante los meses de julio a diciembre.

El diseño experimental consistió en bloques al azar, con 11 tratamientos (T1-T10) y el testigo, (Tabla 1) y 3 repeticiones de cada uno. El tamaño de cada bloque fue de 48 m de ancho por 3 metros de largo, representando una superficie total de 144 m<sup>2</sup> por repetición. El tamaño de las parcelas correspondiente a cada tratamiento fue de 1,4 m x 3 m (7 hileras distanciadas a 0,2 m) representando una densidad de 250 plantas/m<sup>2</sup>. Los bloques estuvieron delimitados con parcelas de *Avena sativa*, para disminuir el efecto borde y además evitar la transferencia de inoculo. Se fertilizó a la siembra con Fósforo como fosfato diamónico (50 kg/ha) y al macollaje con Nitrógeno como urea (100 kg/ha).

### Material vegetal

Se utilizaron para los ensayos semillas de *Triticum aestivum* CV Buck 55CL2 (medianamente susceptible a enfermedades foliares).

### Producción de inóculo de *Z. tritici*

El inóculo se obtuvo a partir de una mezcla de 3 aislamientos de *Zymoseptoria tritici* provenientes de las siguientes localidades de la región triguera: de la localidad de 9 de Julio (FALP9J008), de Pla (FALPLA008) y de Bordenave (FALPB003). Para lograr la esporulación se cultivó el patógeno en cajas de Petri con el medio de agar malta (30 g/l de extracto de malta, 5 g/l de peptona, 2 g/l de extracto de levadura y 20 g/l de agar en agua destilada). Los conidios se obtuvieron inundando las cajas con aproximadamente 5 ml agua destilada estéril y raspando la superficie de la colonia con un ansa esterilizada previamente. La suspensión resultante se filtró con malla tramada y se ajustó a una concentración de 1 x10<sup>6</sup> esporas/ml.

### Producción de inóculo de *Trichoderma harzianum*.

Se utilizaron los aislamientos de *T. harzianum* Tr1=Th5cc y Tr2=Th118. Se cultivaron en medio de agar-papa-dextrosa (PDA 2%), con un fotoperiodo de doce horas de luz, (cerca a la luz UV) a 20 +/- 2°C durante 7–15 días. Los conidios de cada aislamiento se cosecharon inundando las cajas de cultivo con agua destilada estéril y luego raspando la superficie de la colonia con un ansa esterilizada. Posteriormente se filtró a través de dos mallas tramadas y se ajustó la concentración de los propágulos a 1x10<sup>8</sup> conidios/ml.

### Preparación de la semilla

Las semillas de trigo peleteadas con *T. harzianum* (cepa Th5cc y cepa Th118) se prepararon dos días antes de ser sembradas, colocándolas en una solución de hipoclorito de sodio al 5% v/v durante 5 minutos. Mientras tanto se obtuvieron 10 ml de las suspensiones de cada aislamiento de *T. harzianum* que fueron colocadas en 90 ml de

agar – agua al 2,5%. Posteriormente las suspensiones se mezclaron con 85 g de semillas previamente desinfectadas para luego pasarlas al agitador magnético (120 rpm) durante unos 20 minutos. Finalmente y después de drenar el líquido en exceso, las semillas ya peleteadas se secaron bajo una corriente de aire estéril por 3 horas.

El tratamiento testigo consistió en semillas de trigo tratadas con una suspensión de agar-agua y agua destilada sin conidios de *T. harzianum*.

**Tabla 1.** Presentación de tratamientos propuestos.

Tratamiento	Estados de Crecimiento	
Testigo	EC 12,31, 49	Plantas de trigo inoculadas solamente con <i>Z. tritici</i>
T1*	EC 12	Semillas de trigo peleteadas con <i>T. harzianum</i>
T2	EC 12, 31	Semillas de trigo peleteadas con <i>T. harzianum</i> + <i>T. harzianum</i> en aplicación aérea en macollaje
T3	EC 12, 31,49	Semillas de trigo peleteada con <i>T. harzianum</i> + <i>T. harzianum</i> en aplicación aérea en macollaje y espigazón .
T4	EC 12	Semillas de trigo peleteadas con <i>T. harzianum</i> + fungicida foliar en ½ dosis + <i>T. harzianum</i> pulverizado sobre las hojas en plántula.
T5	EC 12,31	Semillas de trigo peleteadas con <i>T. harzianum</i> + aplicación refuerzo aéreo de <i>T. harzianum</i> macollaje + fungicida foliar en ½ dosis en macollaje
T6	EC 12,31,49	Semillas de trigo peleteadas con <i>T. harzianum</i> + aplicación refuerzo aéreo de <i>T. harzianum</i> en macollaje y espigazón + fungicida foliar en ½ dosis en los mismos estadios.
T7	EC 12	Fungicida foliar en dosis completa en plántula.
T8	EC 12,31	Fungicida foliar en dosis completa en plántula y macollaje
T9	EC 12,31,49	Fungicida foliar en dosis completa en plántula, macollaje y espigazón.
T10	EC 49	Fungicida foliar en dosis completa en espigazón

\* El patógeno fue inoculado artificialmente en todos los tratamientos.

## Ensayos de campo para el biocontrol de la mancha de la hoja

La inoculación aérea con *Z. tritici* se hizo en 1-Plántula con cuatro hojas visibles (EC 12), 2-Plantas en estado de primer nudo visible (EC 31), 3-Plantas en estado de primeras aristas visibles (EC 49), siguiendo la escala de Zadoks (Zadoks *et al.*, 1974).

La inoculación con *T. harzianum* se realizó mediante el peleteado de las semillas y por la aplicación aérea en forma de rocío, de una suspensión de conidios del antagonista en dos momentos fenológicos del cultivo: macollaje y espigazón.

Las aplicaciones de fungicida se hicieron (en los tratamientos que lo requerían) en los diferentes estadios, con dosis completa o media dosis de Amistar-Xtra® (Principio Activo: Azoxystrobin -Ciproconazole) siendo la dosis completa de 600 cm<sup>3</sup>/ha.

## Monitoreo de las condiciones ambientales

Se realizó el monitoreo diario de las condiciones ambientales como: la humedad relativa (HR %), la temperatura media (°C), la temperatura del suelo (°C), la radiación, la precipitación acumulada (mm) y la evapotranspiración potencial (ETP mm), con la finalidad de incorporar los resultados a la discusión.

## Evaluación y análisis estadísticos

Se evaluó el control de la enfermedad a través de la disminución de la severidad (porcentaje de área necrosada) en los siguientes estadios de la escala de Zadoks (Zadoks *et al.*, 1974): 1-Alargamiento del primer nudo (EC 31), 2-Inicio de antesis (EC 62), 3-Grano pastoso (EC 82)

Los resultados de severidad para cada uno de los estados fenológicos, para cada uno de los tratamientos, fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon con el test de diferencias mínimas significativas (LSD). Para complementar la evaluación, se calculó la evolución de la enfermedad a través del tiempo, con cada uno de los tratamientos mediante el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) (Shaner y Finney, 1977).



## RESULTADOS

### Ensayos de ajuste en la aplicación del agente de control

Adherencia de conidios después del peleteado.

Los resultados indicaron que la adherencia de los conidios a la semilla fue diferente para cada una de las cepas de *T. harzianum*. Para la cepa Th5cc se detectaron diferencias significativas para cada una de las concentraciones ensayadas (Tablas 2 y 3). La concentración adecuada para lograr la máxima adherencia fue de  $1 \times 10^7$  conidios /ml. (Tabla 3).

**Tabla 2.** Análisis de varianza para la adherencia de conidios de *T.harzianum* (cepa Th5cc) sobre granos de trigo (ufc./g. de semilla).

Variabes	SC	CM	F	P
Concentración	180436	60145,2	24,68	0.0002
Error	19438,7	2437,3		
TOTAL	199934			

**Tabla 3.** Medias para resultados de adherencia de conidios de *T.harzianum* (cepa Th5cc) sobre granos de trigo (ufc./g de semilla).

Concentración	Medias
$10^3$	14,33a
$10^5$	228,66b
$10^8$	281,33bc
$10^7$	338,66c

Letras diferentes dentro de la misma columna, indican diferencias significativas (LSD $\leq$ 0.05)

En relación a la cepa Th118, se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones probadas (Tablas 4 y 5). Para esta cepa la concentración de conidios recomendada para una mayor adherencia es de  $1 \times 10^5$  conidios/ml (Tabla 5) teniendo en cuenta que no existen diferencias significativas con las concentraciones mayores.

**Tabla 4.** Análisis de varianza para la adherencia de conidios de *T.harzianum* (cepa Th118) sobre granos de trigo (ufc./g de semilla).

Variabes	SC	CM	F	P
Concentración	125736	41912,2	7,29	0.0112
Error	45978,7	5747,33		
TOTAL	171715			

**Tabla 5.** Medias de adherencia de conidios de *T.harzianum* (cepa Th118) sobre granos de trigo (ufc./g de semilla).

Concentración	Medias
10 <sup>3</sup>	21,66a
10 <sup>5</sup>	207,33b
10 <sup>8</sup>	258,66b
10 <sup>7</sup>	282,66b

Letras diferentes dentro de la misma columna, indican diferencias significativas (LSD≤0.05)

#### Supervivencia de conidios después de la aplicación aérea

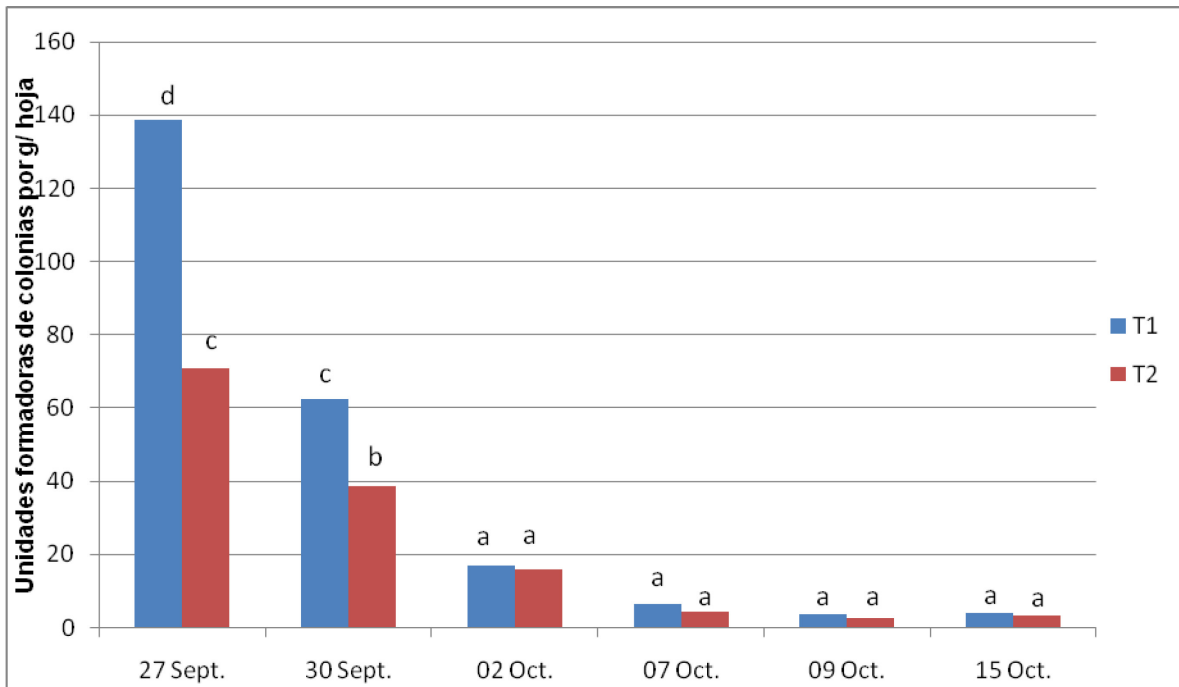
El resultado del ANOVA aplicado sobre el número total de colonias recuperadas desde las hojas pulverizadas con ambas cepas de *T.harzianum*, se presenta en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Análisis de varianza para la supervivencia de conidios de *T.harzianum* sobre hojas de trigo CV Buck 55 CL2 en un experimento de campo.

Variabes	SC	CM	F	P
Fecha	164138	32827,7	101,1	0.0001
Cepa	7824,6	7824,6	24,10	0.0001
Fecha x Cepa	18234,8	3646,9	11,23	0.0001
Error	35062,1	324,6		
Total	225260,1			

El resultado del análisis de los valores medios de colonias recuperadas desde las hojas tratadas, demostró diferencias altamente significativas para las fechas de muestreo, para las cepas y para la interacción fecha x cepa.

La recuperación de los colonias de ambas cepas a través de las diferentes fechas de muestreos se analizaron por el test de LSD y se graficaron en la Fig.4.



Valores medios con letras diferentes dentro de la misma fecha, son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

**Figura 4.** Unidades formadoras de colonias por gramos de hoja (ufc/g de hoja) de las cepas de *T. harzianum* Th5cc (T1) y Th118 (T2) observadas en las fechas propuestas.

El mayor numero de colonias recuperadas desde las hojas tratadas se visualizo a los 4 y 7 días de realizada la pulverización, predominando en ambos períodos el número de colonias (ufc/g de hoja) de la cepa Th5cc con respecto a la cepa Th118. A partir del 10° día del tratamiento el número de colonias de las dos cepas declinó abruptamente igualándose en importancia. Los valores de ufc disminuyeron proporcionalmente para cada cepa sin pérdida viabilidad de los conidios. Se observó una mejor respuesta en la cepa Th5cc bajo las condiciones mencionadas.

Los datos climáticos (T°mínima, T°máxima, T°media; humedad relativa; precipitaciones como mm acumulados; mm/h caídos y radiación diarios) registrados entre el 24 de septiembre y el 15 de octubre no demostraron una dispersión de los valores normales para ese periodo. Por lo tanto la respuesta a la supervivencia de los conidios sobre la hoja no estaría ligada a las fluctuaciones ambientales, siendo propias de cada cepa.

Finalmente, los conidios de *T.harzianum* se mantuvieron viables en la hoja al menos 22 días desde el momento de la aplicación. El valor más alto fue al 4° día registrándose valores diferentes para ambas cepas.

## Experimento de campo

### Clima

En la Tabla 7 se indican los datos climáticos correspondientes a la Estación Experimental Ing. Agr. J. Hirschhorn, obtenidos del Boletín Agrometeorológico para el periodo de evaluación (meses de agosto a diciembre del 2010). Dichos datos fueron analizados por los Ingenieros Agrónomos Marcelo Asborn y Martín Pardi.

**Tabla 7.** Datos climáticos de la estación experimental J. Hirschhorn para el periodo Agosto/Diciembre del año 2010. (F.C.A y F).

Mes/Med.	T media (°C)	T suelo (°C)	Radiacion (Watt/m <sup>2</sup> )	Pp (mm)	ETP (mm)	%H
Agosto	9.8	9.5	2513.3	26.8	54.1	76
Setiembre	13.1	12.8	3171.4	111	72	78
Octubre	14.8	14.7	4621.2	40.4	107	73
Noviembre	18	17.6	5302.2	28	127.7	70
Diciembre	22.6	21.6	6128.9	51	176.2	58

**Tabla 8.** Datos climáticos de los periodos transcurridos entre cada una de las inoculaciones del patógeno.

	T media (°C)	Pp (mm)	%H
15/9 al 12/10	14.24	43.6	76
13/10 al 09/11	16.5	47.8	74.96
09/11 al 12/12	19.6	61.2	67

Como se observa en la Tabla 8, después de la primera inoculación (3ra hoja expandida) no se registraron valores elevados de precipitación diaria (total diario acumulado de 43.6mm) aunque la HR fue propicia para el desarrollo de las lesiones. Además las temperaturas medias de ese periodo fueron las adecuadas para el logro de la infección. Para el periodo transcurrido entre la segunda y tercera inoculación el valor de precipitación acumulado fue de 47.8 mm, no obstante inmediatamente después de la inoculación no se registraron valores elevados de precipitaciones. En cuanto a la temperatura y la humedad continuaron favoreciendo el desarrollo de la infección.

Para el tercer periodo de inoculación, si bien las precipitaciones mostraron un acumulado total de 61.2 mm, el 50% de estas se dieron en el ante penúltimo día previo a la cosecha. Al 5<sup>to</sup> y 6<sup>to</sup> día, 3 días después de la cámara húmeda, se registraron lluvias de baja intensidad (4,5 mm/h) lo que significó un aporte reducido de agua al cultivo. Las temperaturas se mantuvieron dentro de los límites adecuados. No obstante la HR, especialmente en el segundo periodo del mes, se mantuvo por debajo del 65% pudiendo influir en un menor desarrollo de picnidios.

### Severidad

Para la evaluación de la severidad (porcentaje del área de la hoja necrosada) en encañazón (EC 31) se promediaron los valores de las 12 hojas evaluadas correspondientes al nivel de 4ta hoja. Para espigazón (EC 62) se consideraron los valores promedios de la 5ta hoja. Para grano pastoso (EC 82), se tomaron en cuenta los de la HB y HB-1 de las 12 plantas para cada bloque (Tabla 9).

**Tabla 9.** Análisis de varianza de la severidad (porcentaje de superficie necrosada) causada por *Z. tritici* en tres estadios de crecimiento EC 31, EC 62, EC 82) en un ensayo con tratamientos combinados de fungicida químico y *T. harzianum*.

Fuente de variación	G.L	CME <i>Encañazón</i>	P. Val	CME <i>Espigazón</i>	P. Val	CME <i>Grano pastoso</i>	P. Val
Bloque	2	1229,9		295.34		407.8	
Tratamiento	10	1874,86	<0.001	302,61	0.0039	325.18	<0.001
<i>Trichoderma</i>	1	97,58	0.52	0,2	0.963	0.2	0.95
Trat x <i>Tricho</i>	10	39,37	0.99	204,9	0.04	74.74	0.27
Error	42	232,39		94.58		58.55	

El análisis de varianza aplicado a los valores de severidad para los tres estadios de observación muestra valores significativos para el factor Tratamiento. De los otros factores solo la interacción Tratamiento x *Trichoderma* mostro una leve significancia en el estadio de espigazón; para todos los demás no se experimentaron diferencias.

**Tabla 10.** Medias de la severidad producida por *Z.tritici* en los distintos estadios de crecimiento del trigo.

Tratamientos	Severidad (% de necrosis)		
	Encañazón	Espigazón	Grano pastoso
Testigo	60,8 a	82,3 a	79,52 bcd
<i>Tr.</i> Pelet + <i>Z.t</i>	58,6 a	78,1 ab	64,84 f
<i>Tr.</i> Pelet + <i>Tr.</i> aer maco + <i>Z.t</i>	58,6 a	68,8 bc	72,57 cdef
<i>Tr.</i> Pelet + <i>Tr.</i> aer mac + <i>Tr.</i> Aer espig. + <i>Z.t</i>	58,6 a	68,8 bc	91,66 a
<i>Tr.</i> Pelet + FF ½ d plant + <i>Z.t</i>	45,2 a	73,0 abc	77,91 bcde
<i>Tr.</i> Pelet + FF ½ d mac + <i>Tr.</i> aer mac + <i>Z.t</i>	45,2 a	79,8 ab	83,72 ab
<i>Tr.</i> Pelet + FF ½ d mac, espig + <i>Tr.</i> aer mac, espig + <i>Z.t</i>	45,2 a	79,8 ab	80,6 bc
FF plant + <i>Z.t</i>	20,1 b	78 ab	77,52 bcde
FF plant, mac + <i>Z.t</i>	20,1 b	64,1 c	72,83 cdef
FF plant, mac, espig + <i>Z.t</i>	20,1 b	64,1 c	70,1 ef
FF espig + <i>Z.t</i>	20,1 b	64,1 c	71,08 def

Letras diferentes dentro de la misma columna, indican diferencias significativas (LSD $\leq$ 0.05)

Los resultados observados en la tabla 10 muestran que el mejor tratamiento fue *Trichoderma* peleteada en la semilla y evaluado en grano pastoso, ya que el valor medio de severidad fue el menor. Este tratamiento demostró protección hasta madurez avanzada con un valor medio de severidad inferior al del testigo, y al de los restantes tratamientos.

Otros tratamientos destacados fueron el de *Trichoderma* peleteada en la semilla a la que se sumo una aplicación aérea en macollaje y dos aplicaciones aéreas en macollaje y espigazón cuando se evaluó en espigazón. Ambos tratamientos generaron una reducción de la severidad significativamente diferente a la del testigo y equiparable a la protección generada por el fungicida foliar aplicado reiteradamente en plántula, macollaje y aun en espigazón.

### Efecto total de la enfermedad

El efecto total causado por la enfermedad para cada uno de los tratamientos fue calculado a través del área bajo la curva de la severidad (ABCPE) empleando la fórmula de Shaner y Finney (1977) (Tabla 11).

Los valores de ABCPE, calculados para cada uno de los tratamientos demostraron que hubo diferencias significativas entre los mismos. El tratamiento de semilla peleteada y un refuerzo aéreo de *T.harzianum* en macollaje, fue el que demostró menor valor de ABCPE comparado con el testigo. Además otro de los tratamientos destacados con menor enfermedad acumulada en el tiempo, fue el de semilla únicamente peleteada.

Para el caso de los tratamientos con fungicida foliar (FF), el que consistió en la aplicación de un refuerzo al peleteado de la semilla con media dosis del FF en plántula, también demostró un progreso más lento de la enfermedad.

**Tabla 11.** Valores medios de ABCPE producidos por *Z.tritici* en el cultivar Buck 55CL2 protegido por de *T.harzianum* en el experimento de campo.

Tratamiento	ABCPE
Testigo*	2700.43 a
<i>Tr.</i> Pelet + <i>Z.t</i>	2457.96 abc
<i>Tr.</i> Pelet + <i>Tr.</i> aer maco + <i>Z.t</i>	2376.03 bc
<i>Tr.</i> Pelet + <i>Tr</i> aer mac + <i>Tr.</i> Aer espig. + <i>Z.t</i>	2576.5 abc
<i>Tr</i> Pellet + FF ½ d plant + <i>Z.t</i>	2412.4 bc
<i>Tr</i> Pelet + FF ½ d mac + <i>Tr</i> aer mac + <i>Z.t</i>	2592.1 ab
<i>Tr</i> Pelet + FF ½ d mac, espig + <i>Tr</i> aer mac, espig + <i>Z.t</i>	2553.7 abc
FF plant + <i>Z.t</i>	2319.6 c
FF plant, mac + <i>Z.t</i>	2026.6 d
FF plant, mac, espig + <i>Z.t</i>	1997.7 d
FF espig + <i>Z.t</i>	2008.2 d

\*Testigo sólo inoculado con *Z.tritici* y sin protección.

Letras diferentes dentro de la misma columna, indican diferencias significativas (LSD≤0.05)

## DISCUSION:

En la actualidad se está teniendo en cuenta que las sucesivas aplicaciones de productos químicos, atentan contra el medio ambiente, y que las plagas y enfermedades van adquiriendo resistencia debido a la alta presión de selección que se ejerce sobre ellas. En consecuencia, con estos últimos aspectos los investigadores, empresas, técnicos de las Ciencias Agrarias y productores, consideran el inconveniente, y elaboran estrategias de Manejo Integrado de Enfermedades (MIE), buscando rotar los mecanismos de acción utilizados, mejorando la calidad de las aplicaciones y también teniendo en cuenta alternativas como el control biológico. Por otro lado, otra alternativa viable es la resistencia genética. En Argentina los mejoradores han clasificado a los cultivares comerciales como moderadamente resistentes a susceptibles. Esta reacción sugiere la presencia de resistencia cuantitativa no específica en esos cultivares, sin dejar de mencionar a la resistencia cualitativa específica-aislamiento en otros (Simón *et al.*, 2016). El comportamiento del germoplasma contra la MHT se está investigando. Los mismos autores expresaron que los cultivares Pro INTA Puntal, Klein Volcán y Buck 75 Aniversario contenían el mayor número de genes con resistencia específica al patógeno, en cambio en Klein Sagitario, Klein Dragón, Don Ernesto y Buck Arriero se identificaron resistencia cuantitativa o parcial. Los cultivares Argentinos manifestaron patrones de resistencia diferentes a los cultivares extranjeros, generando interés sobre los primeros, por la presencia de nuevos genes con amplio espectro de resistencia que podrán reaccionar a nuevas variantes de *Z. tritici*.

Como se citó anteriormente, el control biológico pasa a ser una alternativa muy interesante. En Argentina se trabajó ampliamente sobre el control biológico de enfermedades foliares en cereales. En el presente trabajo, igualmente a lo obtenido por Perelló *et al.*,(2009.) *T. harzianum* produjo una reducción en la severidad hasta el macollaje, cuando el antagonista se aplicó como recubrimiento en la semilla. Walker (2009), demostró que una sola aplicación del antagonista en la semilla, bajo la forma peleteada, no resultó suficiente para una protección prolongada. Dos aplicaciones aéreas adicionales en los estadios de macollaje y emergencia de aristas aseguraron una reducción de la enfermedad. En coincidencia con este último autor, en este trabajo se obtuvo una protección hasta grano pastoso en dos tratamientos; uno de ellos, cuando la semilla fue solo peleteada (T1) y el otro donde se reforzó el efecto del peleteado con una aplicación aérea de *T.harzianum* en el macollaje (T2).

En relación al tratamiento de sólo peleteado en la semilla, el resultado exitoso estaría asociado con el modelo de acción por el cual *Trichoderma* spp. controla o reduce una enfermedad en la planta. Cuando las esporas del antagonista se adhieren al suelo y están en contacto con raíces de las plantas de trigo, los conidios germinan y crecen sobre la superficie de la raíz. Ellos producen sustancias que estimulan la respuesta de defensa en las plantas (Harman *et al.*, 2004). Para nuestro trabajo, la reducción en la severidad está relacionada con las demostraciones experimentales de Segarra *et al.*, (2001), Cordo *et al.*, (2007) y Stocco *et al.*,(2015). Los autores atribuyeron este efecto a un mecanismo de



Resistencia Sistémica Inducida, a través de elicitores con función enzimática tales como la serin- proteasa.

Así como lo demostrara Shores *et al.*, (2005) para *T. asperellum* como inductor de la resistencia en pepino a una enfermedad bacteriana y otra micótica, las cepas de *Trichoderma* utilizadas en este trabajo, han ejercido un efecto priming al peletear la semilla. Tal como lo expreso Benítez *et al.*, (2004) en la colonización de *Trichoderma* se activan genes como los que codifican a las hidrofobinas, favoreciendo la adherencia de los conidios a las raíces. Se activan así los mecanismos de defensa de la planta. *Trichoderma* permanece en ella como un microorganismo avirulento y simbiote, que estimula su crecimiento (y con ello aumentan los exudados de la raíz que son nutrientes para *Trichoderma*) y la protege de los patógenos directamente y a través de una respuesta inducida (Harman *et al.*, 2004). Se genera así un aumento de la capacidad de defensa de las plantas a través de la producción de ac. jasmónico. Esta ruta de señalización resulta la más estudiada, no obstante en este proceso otras rutas de señalización se han mencionado como la descrita por Aventín (2011) y Stocco *et al.*, (2015) y que involucra la producción de serin proteasa y de su inhibidor desde extractos de plantas de trigo protegidas con el agente biocontrolador.

Con respecto a la utilización de media dosis de fungicida foliar como complemento del peleteado (Tabla 11) se concluyó que, solo el tratamiento en el que el refuerzo se realizó en plántula, resultó apropiados para disminuir la severidad y reducir el progreso de la enfermedad en función del tiempo.

Las plantas poseen dos mecanismos de respuestas inmunológicas: por un lado la adquisición de resistencia sistémica adquirida, que se produce tras el primer contacto (siempre y cuando éste no sea muy severo e intenso) con el patógeno; y la resistencia sistémica inducida por contacto con factores bióticos o abióticos no patogénicos (Viterbo *et al.*, 2002). La manifestación mayor de la adquisición de resistencia se basa en una disminución de los síntomas propios de un patógeno en una especie. El logro de resistencia inducida puede darse también a partir de la inoculación de razas incompatibles del patógeno, con bacterias u hongos no compatibles o muertos, o también con el propio patógeno en estadios en que la planta no es susceptible (Agrios., 2005)

En este trabajo y por primera vez se estudió la adherencia de los conidios a la semilla según la concentración preparada. Las dos cepas de *T.harzianum* respondieron de diferente forma a la adherencia en la semilla. Se concluyó que existe un número límite de conidios en la suspensión, que se adhieren al grano, ya que superada la misma no se recupera mayor cantidad de conidios a pesar de aumentar el número o concentración de los mismos. Esta situación se vió reflejada en los resultados de las ufc/g de semilla cuantificadas. Se aconseja determinar la concentración adecuada de conidios de *Trichoderma* spp. al peletear la semilla antes de organizar un experimento a campo.

Con respecto a la supervivencia de las poblaciones de conidios de *T. harzianum* que se recuperaron después de una aplicación aérea en plantas de trigo, nuestro resultado

coincide con Perelló *et al.*, (2003) para una de las poblaciones de *T.harzianum* sobre trigo que generó protección frente a la mancha amarilla, bajo condiciones de invernáculo. La población disminuyó marcadamente después de la primera aplicación, tal como ocurrió en nuestro experimento. Concluimos también que al cabo de 22 días luego de la pulverización, las poblaciones de *T.harzianum* se mantuvieron viables a pesar de la disminución en su número.

El efecto total de una enfermedad sobre un cultivo es evaluado eficientemente a través del trazado del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (Berger, 1977 y 1988). El cálculo de este parámetro permite analizar y comparar integralmente cultivos sometidos a diferentes manejos culturales y técnicas de control (Marinelli *et al.*, 1992).

Los resultados de ABCPE del presente trabajo, mostraron que el valor más bajo de esta curva se obtuvo con el tratamiento: semilla peleteada con *T. harzianum*, y un refuerzo aéreo en macollaje del mismo biocontrolador. Además se destacaron el de semilla únicamente peleteada con *T. harzianum* y el de semilla peleteada y media dosis de fungicida en plántula, por ser otros tratamientos que generaron un progreso lento de la enfermedad.

En relación a estos resultados, Shaner y Finney (1977) analizaron el progreso del oídio del trigo sobre dos cultivares de diferente susceptibilidad concluyendo que, bajo condiciones nutricionales y ambientales favorables para la enfermedad, la severidad aumentó en mayor medida sobre el cultivar susceptibles pero lo hizo más lentamente sobre el medianamente susceptible. Para el caso del cultivar Buck 55CL2 (medianamente susceptible), sembrado en este experimento para evaluar la acción biofungicida de *T. harzianum*, el progreso lento de la enfermedad pudo ser atribuido en partes a la respuesta genética del cultivar, además del efecto inherente de cada tratamiento, considerando que las condiciones ambientales fueron favorables para el desarrollo de la MHT en todos los estadios evaluados.

Para el caso del tratamiento que utiliza media dosis del FF como refuerzo al peleteado, podría decirse que la aplicación del fungicida, que entre sus componentes presenta estrobirulinas, le proporcionó a la planta un efecto metabólico-fisiológico complementario que llevó a retardar el proceso de necrosis manteniendo el follaje verde por más tiempo.

## CONCLUSIONES

### Hipótesis 1:

El número de ufc de *T.harzianum* por gramo de semilla recuperadas después del peleteado con diferentes concentraciones de conidios aumenta proporcionalmente con el aumento de las concentraciones ensayadas. Los conidios de *T.harzianum* aplicados en la hoja por pulverización, se presentan a una concentración alta sólo una semana después de la aplicación.

La hipótesis 1 se acepta parcialmente.

- La concentración de conidios adheridos a la semilla, cuantificada a través de las ufc./g de semilla no se modifica al aumentar la concentración de la suspensión utilizada para tratar las semillas. Se marca una concentración límite, dependiente de la cepa, que no se modifica por más que aumente la concentración de la suspensión adherente.
- Los conidios aplicados a la superficie de la hoja por pulverización, se mantienen a una concentración alta durante 7 días.

Hipótesis 2: Aplicaciones tempranas del agente biofungicida, como pelet en la semilla, reducen la severidad de la enfermedad sólo en el estadio de plántula.

Hipótesis 2 se rechaza

- Esta hipótesis es rechazada por cuanto una sola aplicación del *T. harzianum* como pelet en la semilla extendió la protección hasta grano pastoso.

Hipótesis 3: Es necesario aplicar un suplemento del biofungicida en estadios posteriores al de plántula, para lograr una reducción de la severidad equiparable a la lograda sólo con fungicida foliar.

La hipótesis 3 es aceptada

- El tratamiento con una aplicación aérea de *T. harzianum* como refuerzo al peleteado en macollaje, favoreció la reducción de la severidad con respecto al testigo, equiparable a la aplicación del fungicida foliar.

Hipótesis 4: La aplicación combinada del biofungicida y del fungicida foliar en media dosis en el estadio de plántula reduce la severidad en forma similar a una sola aplicación de fungicida foliar en un estadio avanzado.

La hipótesis 4 se rechaza

- La aplicación combinada del biofungicida y del fungicida foliar en media dosis, en el estado de plántula, no reduce la severidad en forma similar a una sola

aplicación del fungicida foliar en un estadio avanzado Para los tres estadios de evaluación, la protección conferida por el FF en el estado más avanzado del trigo siempre superó la protección conferida por el tratamiento propuesto.

Concluimos así que para proteger el medio ambiente se recomienda el uso de tratamientos con *T. harzianum* como biofungicida ya que con al menos dos aplicaciones (una de ellas como peleteado en la semilla y un refuerzo como aplicación aérea en macollaje) disminuyó la severidad hasta grano pastoso, marcando además un progreso más lento de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

Adhikari, T.B., Anderson, J.M., Goodwin, S.B. 2003. Identification and molecular mapping of a gene in wheat conferring resistance to *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 93: 1158-1164.

Adhikari, T.B., Cavaletto, J.R., Dubcovsky, J., Gieco, J.O., Schlatter, A.R., Goodwin, S.B. 2004a. Molecular mapping of *Stb4* gene for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Phytopathology* 94: 1198-1206.

Adhikari, T.B., Wallwork, H., Goodwin, S.B. 2004b. Microsatellite markers linked to the *Stb2* and *Stb3* genes for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Crop Science* 44: 1403-1411.

Adhikari, T.B., Young, X., Cavaletto, J.R., Hu, X., Buechley, G., Ohm, H.W., Shaner, G., Goodwin, S.B. 2004c. Molecular mapping of *Stb1*, a potentially durable gene for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Theoretical Applied Genetics* 109: 944-953.

Agrios, G.N. 2005. *Fitopatología*. Ed, Limusa, S.A, Mexico DF, 838 Pag.

Annone, J.G., Calzolari, A., Polidoro, O. 1993. Información adicional sobre efecto de la mancha de la hoja causada por *Septoria tritici* en el rendimiento. *Carpeta de Producción Vegetal Trigo*. Tomo XI Inf. N° 146 EEA, INTA Pergamino, Buenos Aires.

Arraiano, L.S., Chartrain, L., Bossolini, E., Slatter, H.N., Keller, B., Brown, J.K.M. 2007. "A gene in European wheat cultivars for resistance to an African isolate of *Mycosphaerella graminicola*," *Plant Pathology* 56: 73-78.

Arraiano, L.S., Worland, A.J., Ellerbrook, C., Brown, J.K.M. 2001. Chromosomal location of a gene for resistance to *Septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the hexaploid wheat "Synthetic 6x". *Theoretical Applied Genetics* 103: 758-764.

Aventin, J. 2011. Efecto de la aplicación de fungicidas y biofungicidas sobre la severidad de la mancha de la hoja en trigo. Análisis de componentes de la resistencia sistémica inducida. Trabajo Final para la obtención del título de grado: Ingeniero Agrónomo. Fac. de Cs. Agr. y Ftale. UNLP. 37 pp.

Benítez, T., Rincon, A., Limon, M.C., Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology* 7: 249-260.

Berger, R.D. 1977. Application of epidemiological principles to achieve plant disease control *Ann. Rev. Phytopathology* 15: 165-183.

Berger, R. D. 1980. Comparison of the Gompertz and Logistic equations to describe plant disease progress. *Phytopathology* 71: 716-719.

Berger, R. D. 1988. The analysis of effects of control measures on the development of epidemics Pág. 137-151. *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology* (Kranz and Rotem, eds ) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Bowles, D.J. 1990. Defence related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59: 873-907.

Brading, P.A., Verstappen, E.C.P., Kema, G.H.J., Brown, J.K.M. 2002. A gene for gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* blotch pathogen. *Phytopathology* 92: 439-445.

Carmona, M. 2003. Manejo integrado de enfermedades (MIE) en el cultivo de trigo. Información técnica de trigo – Campaña 2003: 6pp. INTA Rafaela.

Carmona, M. 2007. Control químico de enfermedades foliares en el cultivo de trigo. Artículo publicado en la revista *Conciencia Rural*, el 30-11-2007. Versión on-line [http://www.concienciarural.com.ar/agricultura/control-quimico-de-enfermedades-foliares-en-el-cultivo-de-trigo\\_a226](http://www.concienciarural.com.ar/agricultura/control-quimico-de-enfermedades-foliares-en-el-cultivo-de-trigo_a226)

Carmona, M., Barreto, D., López, S., Gally, M., Grijalba, P., Sugía, V. 2004. “Proyecto de Investigación UBACyT. Manejo integrado de enfermedades importantes en soja y cereales de invierno: Alternativas para una producción sustentable. Version on-line [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_pasturas/pasturas\\_combate\\_de\\_plagas\\_y\\_malezas/38-controlar\\_enfermedades\\_en\\_cereales\\_invierno.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_combate_de_plagas_y_malezas/38-controlar_enfermedades_en_cereales_invierno.pdf)

Carmona, M., Reis, E., Cortese, P. 1999. Manchas foliares del trigo . Diagnóstico, epidemiología y nuevos criterios para el manejo, BASF Argentina, SA. 32pp.

Chartrain, L. 2004. Genes for insolate specific an partial resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. John Innes Centre University of East Anglia, Norwich, UK.

Chartrain, L., Brading, P.A., Makepeace, J.C., Brown, J.K.M. 2004. Sources of resistance to *septoria tritici* blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathology* 53: 454-460.

Chartrain, L., Berry, S.T., Brown, J.K.M. 2005a. Resistance on the wheat line Kavkaz-k4500 L.6. A.4 to *Septoria tritici* blotch controlled by isolated-specific resistance genes. *Phytopathology* 95: 664-671.

Chartrain, L., Joaquin, P., Berry, S.T., Arraiano, L.S., Azanza, F., Brown J.K.M. 2005b. Genetics of resistance to *Septoria tritici* blotch in the Portuguese wheat breeding line TE 9111. *Theoretical Applied Genetics* 110: 1138-1144.

Chidichimo, H.O., Sempé, M.E. 2006. Guías de Cerealicultura. Material de apoyo didáctico para las unidades de origen y sistemática de Trigo. UNLP. Pág 1-9.

Cordo, C., Perelló, A., Arriaga, H., Benedicto, G., Avila, V., Zingilino, I. 1994. Resistencia a la "mancha foliar" causada por *Septoria tritici* en el trigo pan (*Triticum aestivum* L.) Rev. Fac. Agronomía. La Plata 70: 23-36.

Cordo, C., Monaco, C., Segarra, C., Simón, M.R., Mansilla, A., Perelló, A., Kripelz, N., Bayo, D., Conde, R. 2007. *Trichoderma* sp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*. Biocontrol Science and Technology 17: 687-698.

Dal Bello, G., Mónaco, C., Simón, M.R. 2002. Biological control of seedling blight of wheat caused *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. World Journal of Microbiology & Biotechnology 18: 627-636.

Dal Bello, G., Sisterna, M., Mónaco, C. 2003. Antagonistic effect of soil rhizosphere microorganisms on *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of wheat seedling blight. International Journal of Pest Management 49: 313-317.

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., Hofe, M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant and Pathology 104: 279-286.

Eriksen, L., Borum, F., Jahoor, A. 2003. Inheritance and localisation of resistance to *Mycosphaerella graminicola* causing *Septoria tritici* blotch and plant height in the wheat (*Triticum aestivum* L.) genome with DNA markers. Theoretical Applied Genetics 107: 515-527.

Elad, Y., Kirschner, B. 1993. Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and population of the plant pathogen *Botrytis cinerea* in modified by abiotic conditions. Phytoparasitica 21: 303-313.

Eyal, Z. 1972. Effect of *Septoria* leaf blotch on the yield of spring wheats in Israel. Plant Diseases Reporter 56: 983-986.

Eyal, Z. 1999. The *septoria tritici* and stagonospora nodorum blotch diseases of wheat. European Journal of Plant Pathology 105: 629-641.

Galich, A.L., Galich, M.T.V. 1996. Enfermedades del trigo en el área sur de Córdoba y Santa Fe. Experiencias en control químico. En primeras jornadas de control químico de enfermedades del trigo en sistemas de manejo de alta productividad. Bolsa de Cereales de Buenos Aires, 27-28 de junio INTA-CIMMYT.

Ghaffari, S.M.T., Faris, J.D., Friesen, T.L. 2011a. "New broadspectrum resistance to *Septoria tritici* blotch derived from synthetic hexaploid wheat". Theoretical Applied Genetics 124: 125-142.

Ghaffari, S.M.T., Robert, O., Laurent, V. 2011b. "Genetic analysis of resistance to *Septoria tritici* blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache". Theoretical Applied Genetics 123: 741–754.

Gullino, M.L., Kuijpers, L.A.M. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. Annual Review Phytopathology 32: 559-579.

Harman, G.E., Howell, R.C., Viterbo, A., Chet, I., Lorito. 2004. *Trichoderma* species. Opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews. Microbiology 2: 43-56

Hanson, L., Howell, C. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. Phytopathology 94: 171-176.

Howel, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D., Puckhaber, L.S., Wheeler, M. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology 90: 248-252.

Kema, G.H.J., Verstappen, E.C.P., Todorova, M., Waalwijk, C. 1996. Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. Current Genetics 30: 251-258.

Knight, S.C., Anthony, V.N., Brady, A.M., Greenland, A.J., Heaney, S.O., Murray, D.C., Powell, K.A., Schullz, M.A., Spinks, C.A., Worthington, P.A., Youle, D. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. Annual Review Phytopathology 35: 349-372.

Koike, N., Hykumachi, M., Kageyama, K., Tsuyumu, S., Doke, N. 2001. Induction of resistance in cucumber against several diseases by plant growth promoting fungi: lignification and superoxide generation. European Journal of Plant Pathology 107: 523-533.

Marinelli, A., March, G.J., Alcalde, M., Acquarone, S. 1992. Análisis y comparación de epifitias de la viruela del maní según distintos sistemas de cultivo. Agriscientia 2: 71-78.

Michereff, N., Da Silveira, S., Reis, A., Mariano, R. 1995. Greenhouse screening of *Trichoderma* isolates for control of *Curvularia* leaf spot of yam. Mycopathology 130: 103-108.

Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Pesca., 2015 (MAGyP) Versión on-line: <http://www.minagri.gob.ar/sitio/index.php>

McCartney, C.A., Brule-Babel, A.L., Lamari, L. 2002. Inheritance of race-specific resistance *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Phytopathology 92: 138-144.



McDonald, B.A., Zhan, J., Yarden, O., Hogan, K., Garton, J., Pettway, R. E. 1999. The population genetics of *Mycosphaerella graminicola* and *Stagonospora nodorum*. In J.A. Lucas, P. Bowyer, & H. M. Anderson (Eds.), *Septoria on cereals: a study of pathosystems* (pp. 44–69). Oxon: CAB Publishing.

McIntosh, R.A., Devos, K.M., Dubcovsky, J. "V Catalogue of gene symbols for wheat Supplement," 2007, <http://wheat.pw.usda.gov/ggppages/wqc/2007upd.html>

Navarrete, F. 2013. Tratamientos combinados con diferentes fungicidas para reducir la severidad de *Septoria tritici* y su impacto sobre el rendimiento de trigo y sus componentes. Trabajo Final para la obtención del título de grado: Ingeniero Agrónomo. Fac. de Cs. Agr. y Ftiles. UNLP. 51 pp.

Perelló, A., Mónaco, C., Sisterna, M., Dal Bello, G. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for Tan Spot of wheat in Argentina. *Crop Protection* 22: 1099-1106.

Perelló, A., Mónaco, C., Moreno, V., Cordo, C., Simón, MR. 2006. The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. koningii* on the control of tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) and leaf blotch (*Mycosphaerella graminicola*) of wheat under field conditions in Argentina. *Biocontrol Science and Technology* 16: 803-813.

Perelló, A., Moreno, V., Mónaco, C., Simón, M.R., Cordo, C. 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* sp. under field conditions in Argentina. *BioControl* 54: 113-122.

Ragsdale, N.N. 2000. The impact of the food quality protection act on the future of plant diseases management. *Annual Review Phytopathology* 388: 577-596.

Rai, B., Singh, D. 1980. Antagonistic activity of some leaf surface microfungi against *Alternaria brassicae* and *Dreschlera graminea*. *Transactions of the British Mycological Society* 75: 363-369.

Rosenberg, D.A. 2003. Factors limiting IPM-compatibility of new disease control tactics for apples in eastern United States. Online. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2003-0826-01-RV.

Rosielle, A.A., Brown, A.G.P. 1979. Inheritance, heredability and breeding behavior of the three sources of resistance to *Septoria tritici* on wheat. *Euphytica* 28: 385-392.

Scharen, A., Bryan, D. 1981. A possible control agent for net blotch of barley. *Phytopathology* 71: 902-903.

Segarra, C.I., Casalongue, C.A., Pinedo, M.L., Cordo, C.A., Conde, R.D. 2001. Changes in wheat leaf extracellular proteolytic activity after infection with *Septoria tritici*. *Journal of Phytopathology* 150: 105-111.

- Shaner, G., Finney, R.E. 1977. The effect of Nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in khox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.
- Shoresh, M., Yedida, I., Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma Asperellum* T203. *Phytopatologia* 95: 76-84
- Simón, M.R., Ayala, F.M., Cordo, C.A., Röder, M.S., Börner, A. 2004. Molecular mapping of quantitative trait loci determining resistance to *Septoria tritici* blotch caused by *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Euphytica* 138: 41-48.
- Simón, M.R., Ayala, F.M., Cordo, C.A., Röder, M.S., Börner A. 2007. The use of wheat/goatgrass introgression lines for the detection of gene(s) determining resistance to *Septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*). *Euphytica* 154: 249-254.
- Simón, M.R., Castillo, N.S., Cordo, C.A. 2016. New sources of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat seedlings. *European Journal of Plant Pathology* DOI 10.1007/s10658-016-0948-0.
- Simón, M.R., Cordo, C.A. 1998. Diallel analysis of the resistance components to *Septoria tritici* in *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* 117: 123-126.
- Simón, M.R., Cordo, C.A., Castillo, N.S., Struik, P. C., Börner, A. 2012. Population Structure of *Mycosphaerella graminicola* and Location of Genes for Resistance to the Pathogen: Recent Advances in Argentina. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Agronomy* Volume 2012, Article ID 680275, 1-7 pag. doi:10.1155/2012/680275.
- Simón, M.R., Cordo, C.A., Perelló, A.E., Struik, P.C. 2003. Influence of Nitrogen Supply on the susceptibility of wheat to *Septoria tritici*. *Journal of Phytopathology* 151: 283-289.
- Simón, M.R., Malagrina, G. 2007. Guías de Cerealicultura. Material de apoyo didáctico para las unidades de enfermedades y plagas en Trigo. UNLP. Pág 55-69.
- Simón, M.R., Perelló, A.E., Cordo, C.A., Larrán, S., Van der Putten, P., Struik, P.C. 2005. Association between *Septoria tritici* blotch, plant height, and heading date in wheat. *Agronomy Journal* 97: 1072-1081.
- Simón, M.R., Perelló, A.E., Cordo, C.A., Struik, P.C. 2002. Influence of *Septoria tritici* on yield, yield components and test weight of wheat under two Nitrogen fertilization conditions. *Crop Science* 42: 1974-1981.
- Sinavimo, Senasa 2013. Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas – SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). Versión on-line <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/septoria-tritici>

- Siqueira de Azevedo, L.A. 2001. Proteção integrada de Plantas com Fungicidas. Ed por Luis Antonio Siqueira de Azevedo, São Paulo, Brasil. 230pp.
- Siqueira de Azevedo, L.A. 2007. Fungicidas Sistêmicos, Teoria e Prática 1ra ed, Campinas: EMOPI. 284pp.
- Stewart, S., Pereyra, S., Diaz de Ackerman, M. 2001. Manejo de manchas foliares de trigo y cebada bajo siembra directa. Reunión técnica sobre siembra directa. INIA. Las Brujas, Canelones, Uruguay.
- Stocco, M.C., Mansilla, A., Mónaco, C., Segarra, C., Lampugnani, G., Abramoff, C., Marchetti, M.F., Kripelz, N., Cordo, C., Consolo, V. 2015. Native isolates of *Trichoderma harzianum* inducing resistance to *Zymoseptoria tritici*, on wheat plants. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 50: 1-11.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L., Chet, I. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* sp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Journal of Antonie van Leeuwenhoek 81: 549-556.
- Walker, G.S. 2009. Perdurabilidad del efecto biocontrolador de dos cepas de *Trichoderma harzianum* (TH5 y TH118) sobre la mancha de la hoja del trigo. Trabajo final para la obtencion del titulo de grado: Ingeniero Agrónomo. Fac. de Cs. Agr. y Ftiles. UNLP. 56 pp.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research 14: 415-421.
- Zhang, X., Haley, S.D., Jin, Y. 2001. Inheritance of *Septoria tritici* blotch resistance in winter wheat. Crop Science 41: 323-326.